

การเปรียบเทียบเทคนิคการกำหนดค่าอ้างอิงของเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหาร โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนักและวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิด โครมาโทกราฟี Comparison of melamine determination as reference value in food simulant by gravimetric method and high performance liquid chromatography

16

จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข¹, พจมาน ทำจีน¹, สมภพ ลาภวิบูลย์สุข¹
Jutathip Lapviboonsuk¹, Pochaman Tagheen¹, Sompop Lapviboonsuk¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการกำหนดค่าอ้างอิงของเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหาร (กรดอะซิติก ร้อยละ 3) สำหรับกิจกรรมทดสอบความชำนาญ โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก (Gravimetric method) และวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ดำเนินการตามวิธีมาตรฐาน DD CEN/TS 13130-27: 2005 ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการกำหนดค่าอ้างอิง ได้ทำการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความเสถียร พบว่า ตัวอย่างเป็นไปตามเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด (ISO 13528: 2005) การกำหนดค่าอ้างอิงของเมลามีนด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิด โครมาโทกราฟี และวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก พบว่าตัวอย่างมีปริมาณเมลามีน 5.04 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.30 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การเปรียบเทียบเทคนิคการกำหนดค่าอ้างอิงใช้ค่า E_n พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ค่าปริมาณเมลามีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Abstract

This study aimed to compare the approaches used for assigning reference values for proficiency testing scheme in food simulant (acetic acid, 3% (w/v)) using gravimetric technique and high performance liquid chromatography (HPLC) as according to DD CEN/TS 13130-27: 2005. The PT samples used in this study were required to investigate for homogeneity and stability. These samples were examined and met the standard requirements (ISO 13528: 2005). The determinations of melamine content were performed by using HPLC and gravimetric method. From the experiment results, the amounts of melamine in food simulant were 5.04 and 5.00 mg/kg, respectively. Moreover, the uncertainties of measurement were also estimated and found that the expanded uncertainties at 95% confidence interval were 0.30 and 0.06 mg/kg, respectively. The comparison between the reference values of HPLC and gravimetric method was performed by using E_n value. The E_n value showed non-significant difference for both determination methods of melamine values.

คำสำคัญ: เมลามีน, สารละลายตัวแทนอาหาร, ไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิดโครมาโทกราฟี, การวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก

Keywords: Melamine, Food simulant, High-performance liquid chromatography, Gravimetric method

¹ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

* Corresponding author E-mail address: jutathip@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

เมลามีน (melamine) เป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกได้นำมาทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ได้เป็นเมลามีนเรซิน (melamine resin) ซึ่งนำมาทำภาชนะเมลามีนสำหรับใช้บรรจุอาหารและได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากมีความสวยงาม น้ำหนักเบา ผิวเรียบเป็นมัน ตกไม่แตกและราคาไม่สูงมาก โดยทั่วไปเมลามีนเป็นสารประกอบที่ไม่มีพิษเมื่อพบในปริมาณน้อย แต่เมลามีนจะมีพิษสูงเมื่อจับตัวกับกรดไซยานูริก (cyanuric acid) เกิดเป็นเมลามีนไซยานูเรต ซึ่งเป็นผลึกที่ไม่ละลายน้ำ ก้อนผลึกเล็กๆนี้จะอุดตันท่อในไต ส่งผลให้เกิดนิ่วในไตทำให้ไม่สามารถผลิตปัสสาวะได้ ก่อให้เกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะ ทำลายระบบสืบพันธุ์ และทำให้ไตวายเฉียบพลันเป็นผลให้เกิดการเสียชีวิตได้ [1]- [5]

องค์การอนามัยโลกจึงได้กำหนดค่า Tolerable Daily Intake (TDI) หรือค่าปนเปื้อนสูงสุดที่ร่างกายได้รับต่อวันโดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของเมลามีนที่ 0.20 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน (WHO, 2009) ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดค่า TDI ที่ 0.63 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และสหภาพยุโรปกำหนดค่า TDI ที่ 0.50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน นอกจากนี้สหภาพยุโรปได้แก้ไขกฎระเบียบเกี่ยวกับการใช้สารเมลามีนให้สอดคล้องกับค่า TDI ดังกล่าว โดยเมื่อวันที่ 10 ธันวาคม 2554 สหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบ Commission Regulation (EU) No 1282/2011 ลงวันที่ 28 พฤศจิกายน 2554 แก้ไข Commission Regulation (EU) No. 10/2011 เรื่องกฎระเบียบว่าด้วยวัสดุพลาสติกและบรรจุภัณฑ์ที่สัมผัสอาหาร ว่าด้วยการลดข้อจำกัดการใช้สารวัสดุสัมผัสอาหาร หมายเลข 239 ชื่อ 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (เมลามีน) โดยลดค่า specific migration limit (SML) หรือค่าสูงสุดที่อนุญาตให้อาหารสัมผัสเมลามีนได้จาก 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็น 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (2.5 mg/kg food) โดยมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 30 ธันวาคม 2554 และประเทศไทยได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 331 (2551) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย และประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดเงื่อนไขอาหารที่ตรวจพบสารเมลามีนและสารในกลุ่มเมลามีน โดยกำหนด นมผงไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และอาหารที่มีนมเป็นส่วนผสม ไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากการออกกฎระเบียบดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของอันตรายจากสารเมลามีนและส่งผลกระทบต่อผู้ส่งออกภาชนะบรรจุอาหารชนิดเมลามีนที่จะต้องผลิตสินค้าให้ได้ตามกฎระเบียบฉบับนี้

การทดสอบหาปริมาณสารเมลามีนจึงมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการส่งออก การดูแลและคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นผลการทดสอบที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือเท่านั้นที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการด้วยกิจกรรมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing; PT) ช่วยยืนยันถึงความถูกต้องและประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติ นอกจากนี้การทดสอบความชำนาญยังเป็นแนวทางหนึ่งในการประกันคุณภาพผลการทดสอบทำให้เกิดความน่าเชื่อถือ และเกิดการยอมรับร่วมในผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดของระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025 ซึ่งการกำหนดค่าอ้างอิงสำหรับกิจกรรมทดสอบความชำนาญ เป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญต่อการประเมินสมรรถนะห้องปฏิบัติการ โดยการประเมินดังกล่าวมีหลายรูปแบบ แต่วิธีที่ได้รับความนิยมคือการประเมินโดยใช้ z-score ดังสมการที่ 1 และมีเกณฑ์การประเมินดังตารางที่ 1

$$z\text{-score} = \frac{(x-X)}{\sigma_{pt}}$$

เมื่อ x คือผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ

X คือค่าอ้างอิง (Assigned value)

σ_{pt} คือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินความชำนาญ

ตารางที่ 1 แสดงเกณฑ์การประเมินสมรรถนะห้องปฏิบัติการโดย z-score

ค่า z-score	เกณฑ์การยอมรับ
$ z < 2$	ผลเป็นที่น่าพอใจ (Satisfactory)
$2 < z < 3$	ผลเป็นที่น่าสงสัย (Questionable)
$ z > 3$	ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ (Unsatisfactory)

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิธีการกำหนดค่าอ้างอิงของเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหารสำหรับเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการหรือกิจกรรมทดสอบความชำนาญ โดยศึกษาเปรียบเทียบ 2 วิธี ดังนี้ วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิควิด โครมาโทกราฟี และวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการของกลุ่มประเทศสมาชิกอาเซียนในกิจกรรม PT ของศูนย์บริหารจัดการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ

2. วิธีการทดลอง (Experimental)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electronic analytical balance) ชั่งได้ละเอียด 0.0001 กิโลกรัม ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Combics3
- 2.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electronic analytical balance) ชั่งได้ละเอียด 0.00001 กรัม ยี่ห้อ Mettler รุ่น XP 205 DR
- 2.1.3 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Waters รุ่น Alliance e2695 และคอลัมน์ HPLC ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Spherisorb NH₂ ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร
- 2.1.4 ตู้อบ (oven) ยี่ห้อ BINDER รุ่น FED115
- 2.1.5 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (deionizer)
- 2.1.6 ชุดอุปกรณ์การกรองพร้อมแผ่นเมมเบรน (membrane filter) ชนิดไนลอน ขนาด 47 มิลลิเมตร 0.20 ไมโครเมตร
- 2.1.7 หัวกรอง (syringe filter) ชนิด PTFE หรือ PVDF ขนาด 13 มิลลิเมตร 0.20 ไมโครเมตร หรือหัวกรองชนิดอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน
- 2.1.8 หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร
- 2.1.9 ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 2.1.10 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปิเปตต์ ขวดแก้วปริมาตร บีกเกอร์ และกระบอกตวงขนาดต่างๆ
- 2.1.11 อ่างน้ำอัลตราโซนิก (ultrasonic water-bath)
- 2.1.12 อะลูมิเนียมฟอยล์

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 อะซิโตรไนโตรลล์ ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ HPLC
- 2.2.2 น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง มีความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 MΩ·cm
- 2.2.3 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต
- 2.2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์
- 2.2.5 สารมาตรฐานเมลามีน ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99.0
- 2.2.6 กรดเกลือละลายชนิดความเข้มข้นร้อยละ 100 ชั้นคุณภาพวิเคราะห์

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างสำหรับกำหนดค่าอ้างอิง เตรียมโดยใช้สารละลายมาตรฐานเมลามีนที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำในสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งทราบปริมาตรที่แน่นอนของทั้งสารมาตรฐานปริมาณ 40 กรัมและสารละลายกรดอะซิติกปริมาณ 8,000 กรัมด้วยการชั่งน้ำหนัก ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการเขย่า แล้วแบ่งบรรจุในขวดพลาสติก ปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.4 การตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) และความเสถียร (Stability)

ตัวอย่างสำหรับกำหนดค่าอ้างอิง ต้องดำเนินการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ขวดและตรวจวัดปริมาณสารเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหาร (กรดอะซิติก ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอย่างละ 2 ข้างแล้วประเมินโดยวิธีทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง (S_s) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินความชำนาญ (σ_{pt}) ตาม ISO 13528: 2015 ดังสมการ

$$S_s \leq 0.3\sigma_{pt}$$

การตรวจสอบความเสถียรของตัวอย่าง ดำเนินการโดยสุ่มตัวอย่างจำนวน 5 ขวดและตรวจวัดปริมาณสารเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหาร (กรดอะซิติก ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งดำเนินการทดสอบในวันที่สิ้นสุดของโปรแกรมทดสอบความชำนาญ แล้วประเมินโดยวิธีทางสถิติตาม ISO 13528: 2015 ดังสมการ

$$|A-B| \leq 0.3\sigma_{pt}$$

เมื่อ A คือค่าเฉลี่ยปริมาณเมลามีนที่ได้จากการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน

B คือค่าเฉลี่ยปริมาณเมลามีนที่ได้จากการศึกษาความเสถียร

2.5 การกำหนดค่าอ้างอิงด้วยเทคนิค

ไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิดโครมาโทกราฟี

ความเข้มข้นของสารเมลามีนคำนวณโดยใช้เครื่อง HPLC จากการเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน โดยการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหารที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่กรองผ่านตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะเครื่อง HPLC ที่เหมาะสมในการทดสอบตาม DD CEN/TS 13130-27:2005 Materials and articles in contact with foodstuffs: Plastics substances subject to limitation, Part 27: Determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine in food simulants [6] ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะการทดสอบเมลามีนด้วยเครื่อง HPLC

รายการ	สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC
คอลัมน์	ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตรและการ์ดคอลัมน์ บรรจุด้วย Spherisorb NH2 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Waters
อุณหภูมิคอลัมน์	40 องศาเซลเซียส
วัฏภาคเคลื่อนที่	อะซิโตรไนโตรล : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5 (75 : 25)
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
เครื่องตรวจวัด	เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี (UV detector): ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

2.6 การกำหนดค่าอ้างอิงโดยวิธีวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก (Gravimetric method)

ความเข้มข้นของสารเมลามีนคำนวณจากการชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานและ

สารละลายตัวแทนอาหาร (กรดอะซิติก ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยเครื่องชั่งที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่งและได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 แล้วคำนวณความเข้มข้นของเมลามีน

2.7 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของค่าอ้างอิง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด ใช้แนวทาง EURACHEM/CITAC Guide: 2012 [7] โดยแจกแจงแหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนในแผนภูมิแกว่งปลา แล้วคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของแต่ละแหล่ง ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.8 การเปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 วิธี

การประเมินความแตกต่างของการกำหนดค่าอ้างอิงระหว่างวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิด โครมาโทกราฟีและวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก โดยใช้การคำนวณจากค่า E_n score เป็นการนำค่าความไม่แน่นอนมารวมใช้ในการเปรียบเทียบกับ ซึ่งการเปรียบเทียบกับค่า t-test นั้นไม่ได้คำนึงถึงค่าความไม่แน่นอนของค่าอ้างอิง แต่ใช้การคำนวณจากค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การประเมินจากค่า E_n โดยพิจารณาถ้า $E_n \leq 1.0$ แสดงว่าการทดสอบจาก 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [8-9] ดังสมการ

$$E_n = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{u_1^2 + u_2^2}}$$

เมื่อ x_1 คือค่าเฉลี่ยปริมาณเมลามีนที่ได้จากวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิด โครมาโทกราฟี

x_2 คือค่าเฉลี่ยปริมาณเมลามีนที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก

u_1 คือค่าความไม่แน่นอนที่ได้จากวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิกวิด โครมาโทกราฟี

u_2 คือค่าความไม่แน่นอนที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก

นอกจากนี้การใช้ค่า E_n เป็นประโยชน์ต่อการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ และความสามารถของผู้เข้าร่วมกิจกรรมฯ ที่มีผลการทดสอบใกล้เคียงกับค่าอ้างอิง (assigned value) ภายใต้ค่าความไม่แน่นอนที่กำหนด

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความเสถียร

การประเมินความเหมาะสมของความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง พิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินความชำนาญ ซึ่งได้ตั้งเป้าหมายไว้ที่ ร้อยละ 10 ของค่าอ้างอิง และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่างต้องมีค่าไม่เกิน $0.3\sigma_{pt}$ โดยค่า σ_{pt} เป็นการกำหนดจากผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งเป็นตามมาตรฐาน ISO 13528: 2015 และมีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง (เมลามีนในสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 3)

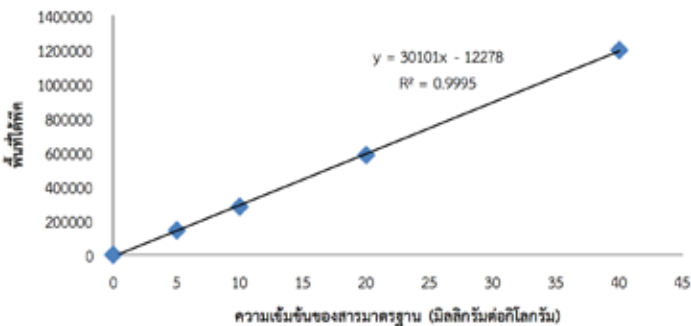
การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของเมลามีน	5.04
	S_s	0.000
	σ_{pt}	0.50
	$0.3\sigma_{pt}$	0.15
	$S_s \leq \sigma_{pt}$	ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

การประเมินความเสี่ยง โดยพิจารณาการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการวัดจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างกับผลการทดสอบความเสี่ยง ตาม ISO 13528: 2015 ซึ่งความแตกต่างต้องมีค่าไม่เกิน $0.3\sigma_{pt}$ ในช่วงเวลาทำการเตรียมตัวอย่างหรือวันที่สิ้นสุดของโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ข้อมูลความเสี่ยงของตัวอย่าง (เมลามีนในสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 3)

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของเมลามีน (B)	5.10
	ค่าเฉลี่ยของเมลามีน (A)	5.04
	$ A-B $	0.06
	σ_{pt}	0.50
	$0.3\sigma_{pt}$	0.15
	$ A-B \leq 0.3\sigma_{pt}$	ตัวอย่างมีความเสี่ยง

3.2 การกำหนดค่าอ้างอิงด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิคโครมาโทกราฟี วิธีที่ได้ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธี รวมทั้งได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 และได้เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญของ FAPAS โดยปริมาณเมลามีนคำนวณจากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 1 พบว่า ค่าอ้างอิงที่ทดสอบด้วยเทคนิค HPLC มีระดับความเข้มข้น 5.04 มิลลิกรัมต่อกรัม



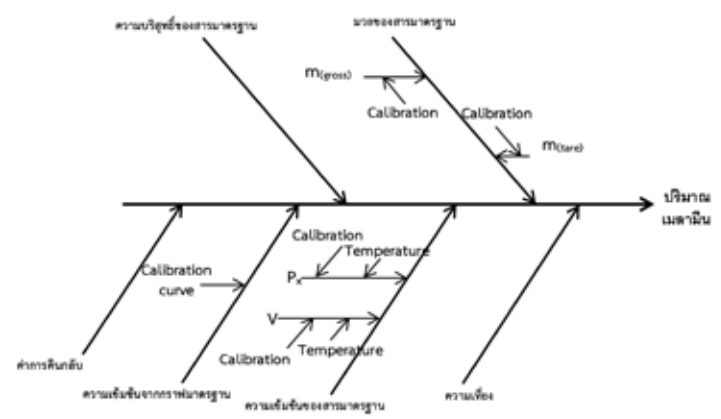
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารเมลามีน

3.3 การกำหนดค่าอ้างอิงโดยวิธีวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก (Gravimetric Method)

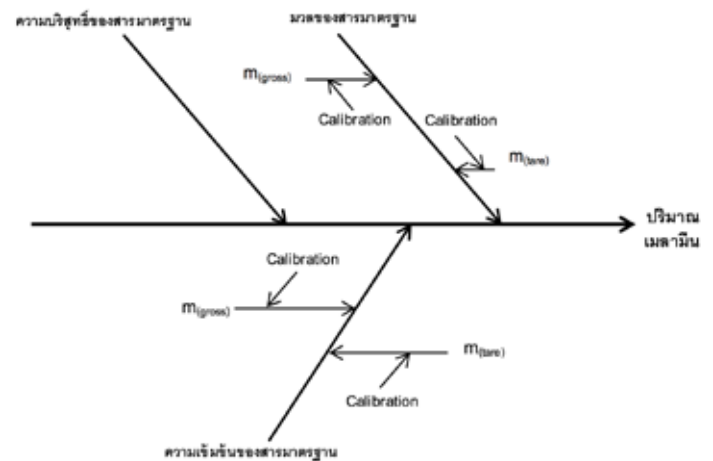
ปริมาณเมลามีนคำนวณจากการชั่งน้ำหนักของสารมาตรฐานและสารละลายตัวแทนอาหาร พบว่า ค่าอ้างอิงมีความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อกรัม

3.4 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของค่าอ้างอิง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตาม EURACHEM/CITAC Guide: 2012 โดยแจกแจงแหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนในรูปแบบภูมิทางปลา แสดงดังรูปที่ 2 สำหรับการกำหนดค่าอ้างอิงด้วยเทคนิค HPLC พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5.04 มิลลิกรัมต่อกรัม มีค่าความไม่แน่นอนรวมเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัม และค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกรัม



รูปที่ 2 แหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนโดยเทคนิค HPLC การประเมินค่าความไม่แน่นอนจากวิธีวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อกรัม มีค่าความไม่แน่นอนรวมเท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมและค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยแหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนแจกแจงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนโดยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก

3.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 วิธี

การประเมินความแตกต่างของการกำหนดค่าอ้างอิงระหว่างวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิคโครมาโทกราฟีและวิธีวิเคราะห์ด้วยน้ำหนักพบว่า E_n มีค่าเท่ากับ 0.13 ดังนั้น $E_n \leq 1$ แสดงว่าการกำหนดค่าอ้างอิงทั้ง 2 วิธีให้ผลที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

4. สรุป (Conclusion)

การกำหนดค่าอ้างอิงของเมลามีนในสารละลายตัวแทนอาหาร เพื่อการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิค HPLC ตามวิธีมาตรฐาน DD CEN/TS 13130-27: 2005 พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณเมลามีน 5.04 มิลลิกรัมต่อกรัม และค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบความชำนาญ โดยการกำหนดค่าอ้างอิงของเมลามีนด้วยวิธี HPLC ให้ค่าที่สอดคล้องกับการกำหนดค่าอ้างอิงด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยน้ำหนัก ซึ่งพบว่า ตัวอย่างมีปริมาณเมลามีน 5.00 มิลลิกรัมต่อกรัม และค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัม การเปรียบเทียบเทคนิคการกำหนดค่าอ้างอิงดำเนินการโดยใช้ค่า E_n พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ค่าปริมาณเมลามีนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ การตรวจวัดปริมาณเมลามีนต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่างๆ เช่น การเตรียมตัวอย่างที่ต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความเสถียรที่เหมาะสมตาม ISO 13528: 2005 การใช้ตัวกรองที่มีความเหมาะสม (PTFE

หรือ PVDF) การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ต้องมีการชั่งและเตรียมอย่างระมัดระวัง รวมทั้งการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่อาจจำเป็นต้องใช้เครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) ช่วยในการละลาย นอกจากนี้การเลือกเทคนิคการตรวจวัดที่เหมาะสมสำหรับการกำหนดค่าอ้างอิงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อผลการทดสอบที่ถูกต้อง การสอบกลับได้ไปที่ SI unit ของการวัดเป็นสิ่งที่สำคัญต่อความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ ในที่นี้ดำเนินการสอบกลับได้โดยสารละลายมาตรฐานและการสอบเทียบเครื่องมือวัด

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid*. Geneva: FAO/WHO, 2009, pp.1-74.
- [2] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Codex Alimentarius Commission*. Agenda Item 5, CX/CF 10/4/5: FAO/WHO, March 2010, pp.1-25.
- [3] LAM, C-W., L. LAN, , X. CHE, S. TAM, S. S-Y. WONG, Y. CHEN, J. JIN, S-H. TAO, X-M. TANG, KY. YUEN, and, P K-H. TAM. Diagnosis and spectrum of melamine-related renal disease: Plausible mechanism of stone formation in humans. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 402, 150-155.
- [4] TOLLESON, WH., G.W. DIACHENKO, and D. HELLER. *Background paper on the chemistry of melamine alone and in combination with related compounds*. Prepared for the WHO Meeting on Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid, in collaboration with FAO and supported by Health Canada, 1-4 December 2008.
- [5] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food*. 30 October 2008.
- [6] DD CEN/TS 13130-27:2005. *Materials and articles in contact with foodstuffs: Plastics substances subject to limitation, Part 27: Determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine in food simulants*.
- [7] EURACHEM / CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd ed. QUAM: 2012 P1
- [8] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 13528: 2005, *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*.
- [9] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL. ISO 17043: 2010, *Conformity assessment – general requirements for proficiency testing*.